



JAPANESE PATENT OFFICE

(19)

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: 2002065278 A
(43) Date of publication of application: 05.03.2002

(51) Int. Cl. C12N 15/09

A61K 48/00, C07K 14/115, C12P 21/02

(21) Application number: 2000264424

(22) Date of filing: 31.08.2000

(71) Applicant: ANGES MG INC

(72) Inventor: KANEDA YASUSHI

(54) GENE TRANSFER VEHICLE CONTAINING HVJ
FUSION PROTEIN

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a gene transfer vehicle which is formed by using a HVJ fusion protein, shows safety and stability and exhibits high gene transfer activity.

SOLUTION: This gene transfer vehicle is obtained by reconstructing a F- protein derived from HVJ (Sendai virus) to which uv rays have not been irradiated or a recombinant F-protein and a HN protein. Further, the method of preparation for this vehicle is provided. This vehicle is a vector useful in a gene therapy.

COPYRIGHT: (C)2002,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-65278

(P2002-65278A)

(43) 公開日 平成14年3月5日 (2002.3.5)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	A 6 1 K 48/00	4 B 0 2 4
A 6 1 K 48/00		C 0 7 K 14/115	4 B 0 6 4
C 0 7 K 14/115		C 1 2 P 21/02	C 4 C 0 8 4
C 1 2 P 21/02		C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 H 0 4 5

審査請求 未請求 請求項の数14 O L (全 20 頁)

(21) 出願番号 特願2000-264424 (P2000-264424)

(22) 出願日 平成12年8月31日 (2000.8.31)

特許法第30条第1項適用申請有り

(71) 出願人 500409323

アンジェス エムジー株式会社

大阪府豊中市新千里東町1丁目四番二号

(72) 発明者 金田 安史

大阪府箕面市小野原東6-12-8

(74) 代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 H V J の融合タンパク質を含有する遺伝子移入ビヒクル

(57) 【要約】

【課題】 H V J の融合タンパク質を使用する、安全かつ安定な、高遺伝子移入活性を有する遺伝子移入ビヒクルが必要とされる。

【解決手段】 U V 照射をしていない H V J 由来か、または組換えの F タンパク質および H N タンパク質を再構成した遺伝子移入ビヒクルが提供される。また、このビヒクルの調製方法も提供される。このビヒクルは、遺伝子治療に有用なベクターである。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 HVJのF融合タンパク質およびHN融合タンパク質を再構成した遺伝子移入ビヒクルであって、RT-PCRによって検出可能な量のHVJゲノムRNAを含まない、遺伝子移入ビヒクル。

【請求項2】 生体内において、40%以上の細胞に対して遺伝子移入活性を有する、請求項1に記載の遺伝子移入ビヒクル。

【請求項3】 再構成融合粒子の調製の4週間後に遺伝子移入ビヒクルを形成した場合に、インビトロにおいて70%以上の細胞に対する遺伝子移入活性を保持する、請求項1に記載の遺伝子移入ビヒクル。

【請求項4】 100kbまでの外来遺伝子を移入し得る、請求項1に記載の遺伝子移入ビヒクル。

【請求項5】 前記F融合タンパク質およびHNタンパク質が、UV照射されていないHVJ由来である、請求項1～4のいずれかに記載の遺伝子移入ビヒクル。

【請求項6】 前記F融合タンパク質およびHNタンパク質が、組換え発現された融合タンパク質である、請求項1～4のいずれかに記載の遺伝子移入ビヒクル。

【請求項7】 前記Fタンパク質が、プロテアーゼによってプロセッシングされたタンパク質である、請求項6に記載の遺伝子移入ビヒクル。

【請求項8】 遺伝子治療のための、請求項1～7に記載の遺伝子移入ビヒクルを含有する薬学的組成物。

【請求項9】 単離された細胞に遺伝子を移入する方法であって、以下；所望の遺伝子を含有する請求項1～8に記載の遺伝子移入ビヒクルを調製する工程、該遺伝子移入ビヒクルによって、該細胞に遺伝子を移入する工程、を包含する、方法。

【請求項10】 HVJの融合タンパク質を含有する遺伝子移入ビヒクルの調製方法であって、以下；UV照射をしていないHVJウイルスから、該融合タンパク質を単離する工程、該融合タンパク質を界面活性剤および脂質の存在下で再構成して、再構成粒子を調製する工程、所望の核酸を充填したリボソームを調製する工程、該再構成粒子および該リボソームを融合する工程、を包含する、方法。

【請求項11】 HVJのFタンパク質およびHNタンパク質を含有する遺伝子移入ビヒクルの調製方法であって、以下；該Fタンパク質およびHNタンパク質を組換え発現する工程、該Fタンパク質をプロテアーゼでプロセッシングする工程、該Fタンパク質およびHNタンパク質を単離する工程、該Fタンパク質およびHNタンパク質を界面活性剤および脂質の存在下で再構成して、再構成粒子を調製する工程、所望の核酸を充填したリボソームを調製する工程、

該再構成粒子および該リボソームを融合する工程、を包含する、方法。

【請求項12】 HVJのFタンパク質およびHNタンパク質を含有する遺伝子移入ビヒクルの調製方法であって、以下；該Fタンパク質をプロセッシングするプロテアーゼを発現する宿主細胞内において、該Fタンパク質およびHNタンパク質を組換え発現する工程、該Fタンパク質およびHNタンパク質を単離する工程、該Fタンパク質およびHNタンパク質を界面活性剤および脂質の存在下で再構成して、再構成粒子を調製する工程、

所望の核酸を充填したリボソームを調製する工程、該再構成粒子および該リボソームを融合する工程、を包含する、方法。

【請求項13】 請求項10～12のいずれか1項に記載の方法によって調製された、遺伝子移入ビヒクル。

【請求項14】 遺伝子治療のための、請求項13に記載の遺伝子移入ビヒクルを含有する薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、インビトロおよび生体内での遺伝子移入のためのビヒクルに関する。特に、本発明は、HVJ（センダイウイルス）のF融合タンパク質およびHN融合タンパク質を再構成したリボソームからなる、遺伝子移入のための遺伝子移入ビヒクルに関する。また、本明細書の遺伝子移入ビヒクルは、遺伝子治療にも使用され得る。

【0002】

【従来の技術】遺伝子治療のために、遺伝子移入のための多くのウイルスおよび非ウイルス（合成）法が開発されている（Mulligan, 1993; Ledley, 1995）。一般に、細胞への遺伝子送達のために、ウイルス法は、非ウイルス法より効果的である。しかし、ウイルスベクターは、親ウイルスからの必須遺伝子要素の同時導入、ウイルス遺伝子のリーキーな発現、免疫原性、および宿主ゲノム構造の改変のため安全性での問題を生じ得る。一般に、非ウイルスベクターは、細胞傷害性および免疫原性がより少ない。しかし、大部分の非ウイルス法は、ウイルスベクターのいくつかに比べ、特に生体内への遺伝子移入効率はより悪い。従って、ウイルスおよび非ウイルスベクターの両方は、制限とともに長所を持っている。それ故、高効率および低毒性を持つ生体内への遺伝子移入ベクターを開発することで、1つのタイプのベクターシステムの制限を、別のタイプのシステムの有利な点を導入することにより補償すべきである。

【0003】この補償の概念で、本発明者らは、ウイルスおよび非ウイルスベクターを組み合わせることにより、新規ハイブリッド遺伝子移入ベクターを開発し、日本血球凝集性ウイルス（HVJ；センダイウイルス）由

来の融合形成性エンベロープを持つ融合形成性ウイルスリボソームを構築した(Kaneda, 1998; Kanedaら, 1999)。この送達システムでは、DNA充填リボソームを、UV不活性化HVJと融合させ、融合形成性ウイルスリボソームであるHVJリボソーム(直径400~500nm)を形成する。融合媒介送達の利点は、DNAをトランスフェクトすることが、受容体細胞におけるエンドソーム分解およびリソソーム分解から保護されることである。100kbまでのDNAがHVJリボソーム中に取り込まれ、そして哺乳動物細胞に送達される。RNA、オリゴヌクレオチドおよび薬物もまた、インビトロおよび生体内で細胞中に効率的に導入される。HVJ-リボソームは、生体内で有意な細胞損傷を誘導することは示されなかった。繰り返したトランスフェクションが、HVJの低い免疫原性のため生体内で成功している(Hiranoら, 1998)。このベクターシステムは改良され、そしてより効率的な遺伝子送達のためにアニオンタイプおよびカチオンタイプHVJ-リボソームが開発された(Saekiら, 1997)。このHVJ-リボソームシステムを用いて多くの遺伝子治療戦略が成功した(Dzauら, 1996; Kanedaら, 1999)。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】しかし、ヒト遺伝子治療のために、このHVJ-リボソームシステムを改良し、完全な安全性を達成すべきである。安全性の観点から、現在のHVJ-リボソームシステムの制限は、HVJゲノムはUV照射により不活性化されてはいるが、融合タンパク質以外の成分がベシクルに含まれることである。HVJ由来の合成ピロソーム(virosome)を構築するためにいくつかの試みがなされた(Wuら, 1995; Ramaniら, 1997, 1998)。

【0005】本発明の目的は、HVJの融合タンパク質を含む再構成融合粒子を提供し、この再構成融合ベシクルを用いるインビトロおよび生体内の効率的、安定かつ安全な遺伝子移入のためのビヒクルを提供することである。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明の1つの局面において、HVJの融合タンパク質を使用する遺伝子移入ビヒクルが提供される。遺伝子移入ビヒクルは、UVで不活化されたHVJの全ピリオンに基づく標準的なHVJリボソームと同程度に効率的に、オリゴヌクレオチド(ODN)およびプラスミドDNAを細胞中に導入する。さらに、HVJの融合タンパク質を含む遺伝子移入ビヒクルはまた、プラスミドDNAを首尾よくマウス筋肉などの組織中の細胞に移入する。本発明の遺伝子移入ビヒクルは、HVJリボソームのトランスフェクション効率と匹敵するトランスフェクション効率を有する。

【0007】本発明の別の局面において、標準的なHV

Jリボソームに対して、安全性および安定性に優れる遺伝子移入ビヒクルが提供される。好ましくは、本発明の遺伝子移入ビヒクルは、RT-PCR解析においてHVJゲノムRNAを含まない。従って、トランスフェクション後のウイルス複製に対する安全性の問題はない。

【0008】本発明の特定の局面において、遺伝子移入ビヒクルおよび再構成融合粒子は、UV照射HVJよりもより安定に保存され得る。本発明のさらなる局面において、遺伝子移入ビヒクルおよび再構成融合粒子は、調製後4週間の時点で高い融合活性を維持し、その結果、高い遺伝子移入活性を維持する。本発明の別の局面において、再構成融合粒子およびDNAを充填したリボソームは、調製後に別々に保存され得、そして次に両方の粒子は、トランスフェクション前に遺伝子移入ビヒクルを構築するために融合され得る。

【0009】本発明のさらに別の実施態様では、組換えFタンパク質およびHNタンパク質を使用する再構成したリボソームを用いる遺伝子移入のためのビヒクルが提供される。また、本発明の1つの局面において、組換え産生される融合タンパク質は、インビトロでプロテアーゼによってプロセッシングされるか、または哺乳動物細胞宿主内において、内在性プロテアーゼによってプロセッシングされる。

【0010】本発明のある局面において、検出可能な量のHVJゲノムRNAを含まない、HVJのF融合タンパク質およびHN融合タンパク質を再構成した遺伝子移入ビヒクルが提供される。

【0011】本発明の別の局面において、インビトロにおいて好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらにより好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の細胞に遺伝子移入活性を有する遺伝子移入ビヒクルが提供される。

【0012】本発明のある局面において、再構成融合粒子の調製の4週間後にビヒクルを形成した場合に、インビトロにおいて50%以上、好ましくは60%以上、より好ましくは70%以上、最も好ましくは80%以上の遺伝子移入活性を保持する遺伝子移入ビヒクルが提供される。

【0013】本発明の別の局面において、生体内での局所投与において好ましくは30%以上、より好ましくは40%以上、さらにより好ましくは50%以上、最も好ましくは60%以上の細胞に遺伝子移入活性を有する遺伝子移入ビヒクルが提供される。

【0014】本発明のさらに別の局面において、100kbまでの外来遺伝子を移入し得る遺伝子移入ビヒクルが提供される。

【0015】本発明の局面において、外来遺伝子の封入効率が20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは40%以上、さらにより好ましくは50%以上である、遺伝子移入ビヒクルの調製方法が提供される。

【0016】本発明の別の局面において、本発明は、この遺伝子移入ビヒクルのF融合タンパク質およびHNタンパク質が、UV照射されていないHVJ由来であるか、または、組換え発現された融合タンパク質である遺伝子移入ビヒクルを提供する。本発明のさらなる局面において、プロテアーゼによってインビボまたはインビトロでプロセシングされた組換えFタンパク質を含む遺伝子移入ビヒクルが、提供される。

【0017】本発明の別の局面において、本発明は、遺伝子治療のために使用される遺伝子移入ビヒクルを提供する。さらに、本発明は、単離された細胞に対する遺伝子移入方法を提供する。

【0018】本発明の別の局面において、本発明は、HVJの融合タンパク質を含有する遺伝子移入ビヒクルの調製方法を提供し、この方法は、以下；UV照射をしていないHVJウイルスから、融合タンパク質を単離する工程、融合タンパク質を界面活性剤および脂質の存在下で再構成して、再構成粒子を調製する工程、所望の核酸を充填したリボソームを調製する工程、再構成粒子および該リボソームをする工程、を包含する。

【0019】本発明のさらなる局面において、本発明は、HVJのFタンパク質およびHNタンパク質を含有する遺伝子移入ビヒクルの調製方法を提供し、この方法は、以下；HVJのFタンパク質およびHNタンパク質を組換え発現する工程、Fタンパク質をプロテアーゼでプロセシングする工程、Fタンパク質およびHNタンパク質を単離する工程、Fタンパク質およびHNタンパク質を界面活性剤および脂質の存在下で再構成して、再構成粒子を調製する工程、核酸を充填したリボソームを調製する工程、再構成粒子および該リボソームをする工程、を包含する。

【0020】本発明のさらなる局面において、本発明は、HVJのFタンパク質およびHNタンパク質を含有する遺伝子移入ビヒクルの調製方法を提供し、この方法は、以下；Fタンパク質をプロセシングするプロテアーゼを発現する宿主細胞内において、Fタンパク質およびHNタンパク質を組換え発現する工程、Fタンパク質およびHNタンパク質を単離する工程、Fタンパク質およびHNタンパク質を界面活性剤および脂質の存在下で再構成して、再構成粒子を調製する工程、所望の核酸を充填したリボソームを調製する工程、再構成粒子および該リボソームを融合する工程、を包含する。

【0021】

【発明の実施の形態】（定義）本明細書で使用される場合、「遺伝子移入」とは、生体内またはインビトロにおいて、標的細胞内に、天然、合成または組換えの所望の遺伝子または遺伝子断片を、導入された遺伝子がその機能を維持するように、導入することをいう。本発明において移入される遺伝子または遺伝子断片は、特定の配列を有するDNA、RNAまたはこれらの合成アナログで

ある核酸を包含する。

【0022】本明細書で使用される場合、「遺伝子移入活性」とは、ビヒクルによる「遺伝子移入」の活性をいい、移入された遺伝子の機能（例えば、発現ベクターの場合、コードされるタンパク質の発現および／またはそのタンパク質の活性など）を指標として検出され得る。

【0023】本明細書で使用される場合、「融合タンパク質」とは、HVJが引き起こす細胞融合に関与する、HVJ由来のタンパク質をいう。

10 【0024】本発明の融合タンパク質は、Fタンパク質およびHNタンパク質を包含する。HVJのFタンパク質およびHNタンパク質は、センダイウイルスのウイルス粒子表面に存在し、ウイルスの感染および膜の融合に関与するタンパク質である。

【0025】本発明の状況内で、融合タンパク質には、野生型タンパク質およびネイティブなタンパク質配列の他の改変体（対立遺伝子を含む）が挙げられる。簡単にいえば、このような改変体は、天然の多型から生じ得るか、または組換え方法論によって合成され得、そして1
20 つ以上のアミノ酸置換、挿入、欠失などによって野生型タンパク質とは異なり得るが、リボソーム中に再構成される場合における遺伝子移入活性を保持することが意図される。例えば、改変体が合成の結果である場合、アミノ酸置換は、保存的である傾向があり、すなわち、極性、非極性、芳香性、荷電などのアミノ酸の群内のアミノ酸の置換である。しかし、改変体がネイティブなタンパク質またはポリペプチドの本質的な機能を保持する限り、改変体が、非保存的置換および本発明の範囲を越えない他の変異を含み得ることは理解されるべきである。
30 改変体は、ネイティブなタンパク質のアミノ酸配列と、少なくとも70%、好ましくは80%、より好ましくは90%、さらに好ましくは92%、さらにより好ましくは95%、最も好ましくは97%以上の同一性を有する。

【0026】本発明の目的のために、同一性パーセントを計算する好ましい方法は、以下を使用するSmith-Watermanアルゴリズムである。グローバルのDNA配列同一性は、以下の検索パラメーター：ギャップオープンペナルティー12、およびギャップ伸長ペナルティー1、を用いるアフィンギャップ検索を使用する、MPSRCHプログラム（Oxford Molecular）において実行されるようなSmith-Waterman相同性検索アルゴリズムにより決定され得る。

【0027】本明細書における融合タンパク質は、HVJウイルス由来の天然タンパク質および組換え発現されたタンパク質の両方を包含する。

【0028】本明細書で使用される場合、「ビヒクル」とは、HVJの融合タンパク質を含有する遺伝子移入のためのビヒクルをいう。
50

【0029】本明細書で使用される場合、「再構成融合粒子」とは、単離されたHVJの融合タンパク質を、界面活性剤および脂質の存在下で再構成した粒子をいう。この再構成融合粒子は、核酸を含有するリボソームと融合して、ビヒクルを形成する。

【0030】本明細書において、「HVJ」および「センダイウイルス」は、互換可能に用いられ得る。

【0031】本明細書において、「HAU」とは、ニトリ赤血球0.5%を凝集可能なウイルスの活性をいい、1 HAUは、ほぼ3000万ウイルス粒子に相当する(Okadaら、1961)。

【0032】(遺伝子治療)治療的な核酸構築物は、本発明の遺伝子移入ビヒクルを用いて局所的にまたは全身的にのいずれかで投与され得る。そのような核酸構築物がタンパク質のコード配列を包含する場合、そのタンパク質の発現は、内因性の哺乳類のプロモーターまたは異種のプロモーターの使用により誘導され得る。コード配列の発現は、構成的であり得るか、または調節され得る。

【0033】本発明の遺伝子移入ビヒクルを遺伝子治療のための組成物として使用する場合、本発明のビヒクルの投与は、PBS(リン酸緩衝化生理食塩水)または生理食塩水などに懸濁したビヒクル懸濁液の局所(例えば、癌組織内、肝臓内、筋肉内および脳内など)への直接注入か、または血管内(例えば、動脈内、静脈内および門脈内)への投与によりなされる。投与量は、部位によって異なるが、例えば、マウス骨格筋に癌遺伝子ワクチンを投与する場合、好ましくは1~500 μ g、より好ましくは5~150 μ g相当のDNAを含有するビヒクルを注入する。さらに、7kbのプラスミドを遺伝子移入ビヒクルを用いて投与する場合の例示的なDNA投与量は、マウスの肝臓、血管、骨格筋および心臓の場合、5~15 μ g、ラットの肝臓および骨格筋の場合、20~30 μ g、サルの骨格筋の場合、50~60 μ g、ならびにヒトの骨格筋の場合、100~150 μ g、である。

【0034】以下の実施例は、例示であって、本発明を限定しないことが意図される。

【0035】

【実施例】UVによって不活性化されたHVJ(日本血球凝集性ウイルス;センダイウイルス)を用い、センダイウイルスの細胞融合性質に基づき、効率的なインビトロおよび生体内遺伝子送達ビヒクルが開発されている。従来の方法によって調製されたビヒクルにおいて、ウイルスゲノムの複製は、HVJ粒子の先立つUV照射により致命的に損傷されるが、HVJのすべてのタンパク質およびゲノムは、HVJリボソーム内に残っている。より安全かつ安定であり、そして高効率の合成遺伝子移入ビヒクルを構築を開発した。

【0036】HVJの融合タンパク質F1およびHNを

ウルイス粒子の温和な溶解により抽出し、そしてイオン交換クロマトグラフィーにより精製した。精製ウイルス融合タンパク質を、界面活性剤可溶化および透析によりリボソーム膜中に挿入し、再構成融合粒子を構築した。これらの粒子は、4週間以上の保存期間に渡り融合活性および遺伝子移入活性を維持した。

【0037】ボルテックス-音波処理により調製されたDNA充填リボソームを、再構成融合粒子と融合し、DNAを細胞に送達した。遺伝子移入ビヒクルを用い、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)標識オリゴヌクレオチドを、標的羊膜FL細胞の核の100%中に導入した。さらに、再構成融合リボソームを用いたヒト293細胞のトランスフェクション時のルシフェラーゼ遺伝子発現は、標準的HVJリボソームとほとんど同じであった。また、新規ビヒクルにより、LacZ遺伝子を、マウス骨格筋中に導入したところ、40~50%の筋繊維がLacZ遺伝子発現を示した。

【0038】(ウイルス)HVJ、Z株を、先に記載のように(Kaneda、1994)差示的遠心分離により精製した。精製HVJを平衡化塩溶液(BSS:137mM NaCl、5.4mM KCl、10mM Tris-HCl、pH7.5)中に再懸濁し、そしてウイルス力価を、540nmにおける吸光度を測定することにより決定した。540nmにおける光学的密度は、15,000血球凝集単位(HAU)に対応し、融合活性と相関する。

【0039】(HVJからのFおよびHN融合タンパク質の抽出)エタノール中に溶解した、Nonidet P-40(NP-40)およびフェニルメチルスルホンフルオリド(PMSF)を、それぞれ0.5%および2mMの最終濃度で精製HVJ懸濁液の20ml

(1,750,000 HAU)に添加した。この混合物を、回転しながら、4℃で30分間インキュベートした。次いで、この懸濁液を、100,000g、4℃で75分間遠心分離し、不溶性タンパク質およびウイルスゲノムを除去した(Uchidaら、1979)。上清液を、5mMリン酸緩衝液(pH6.0)に対して3日間透析し、緩衝液を毎日交換することにより、残存NP-40およびPMSFを洗い流した。透析した溶液を、100,000g、75分間4℃で遠心分離し、不溶性物質を取り除いた。上清液を、先に記載した方法(Yoshimuraら、1981)に基づき0.3Mスクロースおよび1mM KClを含む10mMリン酸緩衝液(pH5.2)で平衡化したCM-Sepharose CL6B(Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden)のイオン交換カラムにアブライした。素通り画分および0.2M NaCl溶出液を集めた。両画分を、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)にかけ、タンパク質成分を分析した。ゲルを

クマシーブリリアントブルーで染色し、そして各タンパク質の比率を、コンピューター化デンストメトリー (NIH Image; Apple Computers, Cupertino, CA, USA) を用いて評価した。

【0040】(組換え発現)HVJの融合タンパク質は、融合タンパク質をコードする遺伝子を、発現ベクターに組み込み、適切な宿主細胞において発現することによっても、調製され得る。Fタンパク質およびHNタンパク質のアミノ酸配列として、例えば、配列番号2(図7)および配列番号4(図8)が挙げられ得る。

【0041】種々の宿主細胞に使用され得る発現ベクターとしては、市販の各種のベクターを使用し得る。

【0042】融合タンパク質をコードする発現ベクターは、細胞に導入され得、当該分野において公知でありそして記載される任意の種々の方法(例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed, Vols 1 to 3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989)、およびAusubelら、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, MD (1994)、これらの各々は、本明細書において参考として援用される)によって、本発明の融合タンパク質を産生し得る。組換え発現ベクターを原核生物または真核生物細胞中に導入する方法として、例えば、エレクトロポレーション法などの、形質転換またはトランスフェクション法が挙げられる。

【0043】組換えFタンパク質を大腸菌で発現した場合、不活性なF0形態として発現された。大腸菌で発現された不活性なF0形態のタンパク質を活性化F1形態に変換するためには、0.0004~0.001%トリブシンを用いる37℃30分間のトリブシン処理が必要とされた。

【0044】トリブシン処理された活性化F1タンパク質に対応するポリペプチドは、短縮された活性化F1のアミノ酸配列をコードする遺伝子を含む発現ベクターを用いて、大腸菌で発現され得る。短縮されたF1タンパク質は、少なくとも、117番目のフェニルアラニンから142番目のアラニンまでの26アミノ酸残基を含む必要がある。短縮型タンパク質が封入体を形成する場合は、封入体をリフォールディングすることにより、活性型タンパク質を得ることが当業者にとって容易に可能である(Robert F. KelleyおよびMarjorie E. Winkler, Genetic Engineering, (1990) vol. 12, 1~19頁を参照のこと)。

【0045】HVJが複製し得る細胞(例えば、げっ歯

類の気管上皮細胞; ニワトリ胚; サル腎臓の初代培養細胞; ヒト胎児肺、腎臓、羊膜の初代培養細胞)を宿主細胞として使用してFタンパク質を発現させる場合、発現された全長Fタンパク質が宿主細胞の内在性プロテアーゼにより切断され、その結果として活性化されるため、活性型Fタンパク質を発現および単離することが可能である。あるいは、Triptase clara (Kidoら、1999)を、内在性の酵素として発現する宿主細胞(例えば、ラットの気管上皮細胞)、または組換え的に発現する宿主細胞もまた使用され得る。

【0046】これら発現ベクターの選択および構築方法、宿主細胞への導入方法、宿主細胞での発現方法、ならびに発現タンパク質の回収方法は、当業者にとって周知である。

【0047】(遺伝子移入ビヒクルの調製) 3.56 mg ホスファチジルコリンおよび0.44 mg コレステロールの脂質混合物を、クロロホルム中に溶解し、そしてこの脂質溶液を、ロータリーエボレーター中で蒸発させた(Uchidaら、1979)。乾燥脂質混合物を、0.85% NP-40を含む2.0 mlの上記素通り画分からのタンパク質溶液(1.6 mg)中にボルテックスにより完全に溶解した。次いで、この溶液を0.3M スクロースおよび1mM KClを含む10mMリン酸緩衝液(pH7.2)に対して透析し、NP-40を除去した。透析は、毎日緩衝液を交換して6日間実施した。この透析された溶液を、0.3M スクロースおよび1mM KClを含む10mMリン酸緩衝液(pH5.2)で平衡化したアガロースビーズ(Bio-Gel A-50m)(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)にアブライした。540nmにおける光学的密度が1.5を超える画分を再構成融合粒子として集め、そして以下に記載のように10mg脂質から調製された核酸充填リボソームと融合し、遺伝子移入ビヒクルを調製した。

【0048】(安全性)

1) RT-PCRによる安全性試験

上記のように調製した遺伝子移入ビヒクルが、HVJゲノムRNAを含有するのか、以下のようにRT-PCRを行った。

【0049】全細胞RNAをISOGENリボヌクレオチド単離キット(Nippon Gene Co. Ltd.)を、製造業者のプロトコールに従い、トランスフェクションの2日後に単離した。RT-PCR反応は、0.3mMのdNTP、1Xの反応緩衝液、5単位のrTth DNAポリメラーゼ、20単位のRNase阻害剤、2.5mMの酢酸マンガニン(Toyobo)、および0.4μMのセンスおよびアンチセンスプライマーを含有する反応溶液(総容量50μl)中で、Gene Amp PCRシステム2400(Perkin-Elmer)を用いて行った。

【0050】プライマーは、HVJのFタンパク質コード配列の715 bpフラグメントをPCR増幅するよ

センス鎖

5' GTGATTGGTACTATCGCACTT 3'

アンチセンス鎖

5' CTGGCTGTCAGGTATCAGTTG 3'

反応混合物を、60℃30分での逆転写を1サイクル；94℃3分間および50℃1.5分間での1サイクルのPCR増幅；94℃1分間および50℃1.5分間での38サイクルのPCR増幅；94℃1分間および50℃8.5分間での1サイクルのPCR増幅；に供した。全てのアッセイを三連で行った。RT-PCR産物を、臭化エチジウムの存在下でアガロースゲル電気泳動に供して、UVイルミネーターで分析した。Fタンパク質をコードする配列の存在を示す715 bpのバンドは、トランスフェクション後のサンプルにおいて観察されなかった。

【0051】以上の結果より、上記の遺伝子移入ビヒクルがHVJゲノムRNAを含有しないことが明らかとなった。従って、この遺伝子移入ビヒクルは、ウイルス複製を生じないので、安全であり、かつ免疫系に対する刺激は非常に弱い。

【0052】2) 免疫原性に関する安全性試験

さらに、この遺伝子移入ビヒクルは、ウイルスの免疫原性の原因と考えられるHVJのNPタンパク質(Coleら、1997；Chenら、1998)を実質的に含有しない。従って、この遺伝子移入ビヒクルは、NPタンパク質を含有するHVJリボソームよりも、免疫原性が低いと考えられる。この遺伝子移入ビヒクルの免疫原性は、HVJリボソーム系について報告された再構成ビヒクルの生体内への繰返し注入によって、分析され得る(Hiranoら、1998)。

【0053】(フルオレセインイソチオシアネート標識オリゴヌクレオチドを含む遺伝子移入ビヒクルの調製)フルオレセインイソチオシアネート(FITC)-オリゴヌクレオチド(ODN)を、先に記載のように(Morishita、1994)リボソーム中に取り込んだ。簡単に述べれば、10mgの乾燥脂質混合物(ホスファチジルセリン、ホスファチジルコリンおよびコレステロール)を、20 nmole FITC結合ODN(5'-GAT-CCG-CGG-GAA-ATF-3'；Clontech Laboratories、Inc.、Palo Alto、CA、USA)を含む200μlのBSS中で水和した。FITC-ODN充填リボソームを、ボルテックスすることおよび音波処理により調製した。この20 nmoleのFITC-ODNを含むリボソーム(10mgの脂質を含む)を、4mgの脂質を含む再構成融合粒子と4℃で10分間、次いで37℃で60分間インキュベートした。このFITC-ODNを含む遺伝子移入ビヒクルを、先に記載のように(Kaneda、1994)スクロース勾配超遠心分離により精製した。

*うに設計された(Hokkaido System Science Co. Ltd.)。

【0054】(FITC-ODNのFL細胞への移入)ヒト羊膜FL細胞を、10%ウシ胎児血清(FCS)を補填したダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)中で、上記のように調製したFITC-ODNを有する遺伝子移入ビヒクルの1/10と、37℃で30分間インキュベートした。次いで、細胞を、新鮮培地で洗浄してビヒクルを除去し、そして1%酢酸を含む冷メタノールを用いて、4℃で5分間、固定した。リン酸緩衝化生理食塩水で洗浄した後、核を、1μg/ml Hoechst 33258(Sigma Chemicals Inc.、St. Louis、MO、USA)で5分間染色した。次いで、FITC-ODNを受け入れた細胞を、蛍光顕微鏡で観察した。

【0055】(ヒトHEK293株由来のトランスフェクト細胞におけるルシフェラーゼ遺伝子発現)pCMV-ルシフェラーゼ(7.4 kb)を、pGEM-luc(Promega Corp.、Madison、WI、USA)からのルシフェラーゼ遺伝子を、pCDNA3(5.4 kb)(Invitrogen、San Diego、CA、USA)中に、HindIIIおよびBamHI部位でクローニングすることにより構築した。約40μgのpCMV-ルシフェラーゼを含む遺伝子移入ビヒクルを、先に記載のように構築し、そしてこの遺伝子移入ビヒクル(約 1.5×10^{11} 粒子/ml、DNA濃度は約40μg/ml)の1/10量(100μl)を、ヒト293細胞株(ヒト胎児腎臓：HEK)由来の2×10⁵細胞とインキュベートした。HVJリボソームを用いて、また同量のルシフェラーゼDNAを2×10⁵HEK293細胞に移入した。移入24時間後、細胞を回収し、そして他に記載のように(Saekiら、1997)、ルシフェラーゼ活性アッセイにかけた。

【0056】(マウス筋肉へのLacZ遺伝子移入)発現ベクターpAct-LacZ-NIIを、先に記載のように(Saekiら、1997)構築した。8週令の雄C57BL/6マウスを、希釈ペンタバルビタール(1mg)の腹腔内注射により麻酔した。上記のように調製された、40μgのpAct-LacZ-NIIを含む遺伝子移入ビヒクルの1/3(DNA濃度は約40μg/ml)を、26Gニードルを備えた1mlシリンジを用いて四頭筋中に直接注射した。移入3日目に、注入部位の筋肉を単離し、1%グルタルアルデヒドで固定し、20%スクロースに一晩浸漬し、そして凍結切片(10μm)を、クリオスタット(Miles-San kyo、Kanagawa、Japan)で切断した。LacZ遺伝子発現は、他に記載のように(Sanes

ら、1986) 検出した。

【0057】(実施例1)

(HVJからの融合タンパク質の精製) 融合タンパク質の精製のために、NP-40処理したHVJの溶解物を、超遠心によって明澄化した。上清のタンパク質を、さらなる精製の前に、SDS-PAGEによって分析した(図1a)。この上清は、HVJ由来の多くのタンパク質を含んでいた。次に、この上清を、イオン交換クロマトグラフィーにアブライした。52kDaおよび72kDaタンパク質が主に、素通り画分に溶出された(図1b、レーン1)。SDS-PAGEでの移動度によって、これら2つのタンパク質を、それぞれF1およびHNであると同定した(Okada, 1993)。52kDaタンパク質の下のかすかなバンドは、融合タンパク質(F1およびHN)の分解産物であると考えられた。なぜなら、これらのタンパク質は、異なる実験間で再現性がなかったからである。タンパク質を、さらに0.2M NaClによって溶出した。しかし、融合タンパク質は、効率よくは得られなかった。そしてHVJのNPタンパク質であると推測されるさらなる60kDaタンパク質が出現した(図1b、レーン2)。結果として、素通り画分のみを、さらなる実験の融合タンパク質の供給源として使用した。デンストメトリーは、素通り画分のF1対HNの濃度比が2.3:1であることを示した。このことは、ウイルスエンベロープ中の両タンパク質の比と一致した。以前の論文(Nakanishiら, 1982)は、この比がHVJの効率的な融合に必要であると報告している。

【0058】(実施例2)

(再構成融合粒子の調製) 融合タンパク質をNP-40で可溶化された液体混合物に添加し、そしてリボソームを、透析によって調製した。このリボソームは、F1およびHNを含有した(図1b、レーン3)。しかし、発明者は、透析によって同一のリボソーム内にDNAを捕獲し得なかった。DNAを含有する融合粒子は、空の融合粒子と、ボルテックス音波破碎法によって調製されたDNAを充填したリボソームとを、インキュベートすることにより構築された。構築の模式図を、図2に示した。

【0059】(実施例3)

(再構成融合粒子による、FITC-ODNの、培養細胞への導入) トランスフェクションの30分後、FITC-ODNが、FL細胞の全ての核中に見出された(図3aおよび4)。融合粒子を用いない場合、非常に小さなシグナルが、FL細胞中に見出された(図3b)。遺伝子移入ビヒクルによって達成されたFITC-ODN導入の効率は、HVJビリオン全体のUV照射に基づく標準的なHVJリボソームの効率に匹敵した。

【0060】空の再構成融合粒子を、4℃で1~4週間保存し、そしてFITC-ODNを含有する再構成融合

粒子を、毎週の間隔で構築し、FITC-ODNをFL細胞に導入した。4週間保存した再構成融合粒子を使用して、80%を越える細胞中に、FITC-ODNを導入した(図4)。

【0061】比較のために、従来法に従い、10mg脂質を含むリボソームに、20nmoleのFITC-ODNをボルテックス音波処理により取り込ませ、このリボソームを198mjoule/cm²の紫外線照射により不活化したHVJ(15000 HAU相当)と融合させ、遊離のHVJをスクロース勾配超遠心分離によって精製することにより、FITC-ODNを充填したHVJリボソームを調製し、1~4週間4℃で保存した。このHVJリボソームを用いて、遺伝子ビヒクルを調製した場合、FITC-ODNの細胞核への導入の効率は、劇的に減少した。4℃で1週間のみ保存した不活化HVJを用いて調製したHVJリボソームを使用すると、遺伝子移入の効率は、10%未満にまで減少した。

【0062】(実施例4)

(再構成した融合タンパク質を使用する、インビトロにおける遺伝子発現) 図2に示すように、ルシフェラーゼ遺伝子を充填した遺伝子移入ビヒクルを調製し、そしてHEK293細胞に添加した。移入の1日後、細胞中のルシフェラーゼ活性を、以前に報告されたように(Saekiら, 1997)、測定した。図5に示すように、遺伝子移入ビヒクルを用いて得られるルシフェラーゼ遺伝子発現は、HVJリボソームを用いて得られる発現と、ほとんど同一であった。FおよびHNタンパク質の両方が、ウイルス細胞融合のために必要とされる。実際には、以前に報告されたように(BagaiおよびSanker, 1993)再構成ベシクル中に取り込まれる前に、HNタンパク質を3mM ジチオトレイトール(DTT)で不活化した場合、ルシフェラーゼ遺伝子移入は、劇的に減少した。

【0063】手短には、融合タンパク質を精製し、HN不活化DTT処理に曝露し、そして再構成リボソームを調製するために使用した。結果としてのベシクルは、ルシフェラーゼ遺伝子をHEK293細胞に移入し得たが、低い効率であった。これらの条件下において、ルシフェラーゼ活性は、インタクトな再構成融合粒子を用いて得られたレベルの10%未満であった。

【0064】(実施例5)

(再構成した融合タンパク質を使用する、生体内における遺伝子発現) LacZ遺伝子を、遺伝子移入ビヒクルを用いて、生体内で直接マウス骨格筋に移入した。図6に示すように、LacZ発現は、筋繊維の40~50%において見出された。マウス筋肉において有意な毒性は、見出されなかった。

【0065】上記から、本発明の特定の実施態様が例示の目的について本明細書に記載されるが、種々の改変が、本発明の意図および範囲から逸脱せずに行われ得る

ことは、明らかである。したがって、本発明は、添付の請求の範囲以外によっては限定されない。

【0066】

【発明の効果】本発明は、HVJの融合タンパク質を使用する遺伝子移入ビヒクルを提供する。本発明の遺伝子移入ビヒクルは、UVで不活化されたHVJの全ビリオンに基づく標準的なHVJリボソームと同程度に効率の*

＊に、ODNおよびプラスミドDNAを細胞中に導入する。さらに、本発明の遺伝子移入ビヒクルは、安全であり、かつ安定に保存され得る。

【0067】（参考文献）

【0068】

【表1】

- Bagni, S. and Sarker, D.P. (1993). Targeted delivery of hygromycin B using reconstituted Sendai viral envelopes lacking hemagglutinin-neuraminidase. *FEBS Lett.*, 326: 183-188.
- Chen, Y., Webster, R.G. and Woodland, D.L. (1998). Induction of CD8+ T cell responses to dominant and subdominant epitopes and protective immunity to Sendai virus infection by DNA vaccination. *J. Immunol.*, 160: 2425-2432.
- Cole, G.A., Hogg, T.L., Coppola, M.A. and Woodland, D.L. (1997). Efficient priming of CD8+ memory T cells specific for a subdominant epitope following Sendai virus infection. *J. Immunol.*, 158: 4301-4309.
- Dzau, V.J., Mann, M., Morishita, R. and Kaneda, Y. (1996). Fusogenic viral liposome for gene therapy in cardiovascular diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 11421-11425.
- Hirano, T., Fujimoto, J., Ueki, T., Yamamoto, H., Iwasaki, T., Morishita, R., Sawa, Y., Kaneda, Y., Takahashi, H. and Okamoto, E. (1998). Persistent gene expression in rat liver *in vivo* by repetitive transfections using HVJ-liposome. *Gene Ther.*, 5: 459-464.
- Kaneda, Y. (1994). Virus (Sendai virus envelopes) mediated gene transfer. In: *Cell Biology: A Laboratory Handbook*, J.E. Celis (Ed.), Academic Press, Orlando, Florida, vol. 3, pp. 50-57.
- Kaneda, Y. (1998). Fusogenic Sendai-virus liposomes: a novel hybrid type liposome for gene therapy. *Biogenic Amines*, 14: 553-572.
- Kaneda, Y., Sasaki, Y. and Morishita, R. (1999). Gene therapy using HVJ-liposomes; the best of both worlds. *Mol. Med. Today*, 5: 298-303.
- Kido, H., Murakami, M., Oba K., Chen, Y., and Towatari, T.: Cellular proteinases trigger the infectivity of the Influenza A and Sendai viruses. *Molecular Cells* 9, 235-244, 1999.
- Ledley, F.D. (1995). Non-viral gene therapy: the promise of genes as pharmaceutical products. *Hum. Gene Ther.*, 6: 1129-1144.
- Morishita, R., Gibbons, G.H., Kaneda, Y., Ogihara, T. and Dzau, V.J. (1994). Pharmacokinetics of antisense oligonucleotides (cyclin B1 and cdc 2 kinase) in the vessel wall: enhanced therapeutic utility for restenosis by HVJ-liposome method. *Gene*, 149: 3-9.
- Mulligan, R.C. (1993). The basic science of gene therapy. *Science*, 260: 926-932.
- Nakanishi, M., Uchida, T. and Okada, Y. (1982). Glycoproteins of Sendai virus (HVJ) have a critical ratio for fusion between virus envelopes and cell membranes. *Exp. Cell Res.*, 142: 95-101.
- Okada, Y., Nishida, S., and Tadokoro, J.: Correlation between the hemagglutinating titer and the virus particle number of HVJ. *Biken J.* 4, 209-213, 1961.
- Okada, Y. (1993). Sendai-virus induced cell fusion. In: *Methods in Enzymology*, N. Duzgunes (Ed.), Academic Press, San Diego, Vol. 221, pp. 18-41.
- Ramani, K., Bora, R.S., Kumar, M., Tyagi, S.K. and Sarkar, D.P. (1997). Novel gene delivery to liver cells using engineered virosones. *FEBS Lett.*, 404: 164-168.
- Ramani, K., Hassan, Q., Venkiah, B., Hasnain, S.E. and Sarkar, D.P. (1998). Site-specific gene delivery *in vivo* through engineered Sendai viral envelopes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 11886-11890.
- Sasaki, Y., Matsumoto, N., Nakano, Y., Mori, M., Arai, K. and Kaneda, Y. (1997). Development and characterization of cationic liposomes conjugated with HVJ (Sendai virus): Reciprocal effect of cationic lipid for *in vitro* and *in vivo* gene transfer. *Hum. Gene Ther.*, 8: 1965-1972.
- Sanes, J.R., Rubenstein, J.L. and Nicolas, J.F. (1986). Use of a recombinant retrovirus to study post-implantation cell lineage in mouse embryo. *EMBO J.*, 5: 3133-3142.
- Uchida, T., Kim, J., Yamaizumi, M., Miyake, Y. and Okada, Y. (1979). Reconstitution of lipid vesicles associated with HVJ (Sendai virus) spikes; purification and some properties of vesicles containing nontoxic fragment A of diphtheria toxin. *J. Cell Biol.*, 80: 10-20.
- Wu, P., de Fiebre, C.M., Millard, W.J., Elmstrom, K., Gao, Y. and Meyer, E.M. (1995). Sendai viroosomal infusion of an adeno-associated virus-derived construct containing neuropeptide Y into primary rat brain cultures. *Neuroscience Lett.*, 190: 73-76.
- Yoshima, H., Nakanishi, M., Okada, Y. and Kobata, A. (1981). Carbohydrate structures of HVJ (Sendai virus) glycoproteins. *J. Biol. Chem.*, 256: 5355-5361.

【0069】

※ ※ 【配列表】

SEQUENCE LISTING

- <110> MedGene Bioscience, Inc.
- <120> A Gene Transfer Vehicle Comprising HVJ Fusion Proteins
- <130> J100083473
- <140>
- <141> 2000-08-31
- <160> 4
- <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
 <211> 1813
 <212> DNA
 <213> Sendai virus
 <220> cDNA to viral ss-RNA
 <221> CDS
 <222> (54)..(1751)
 <223> F protein
 <223> mature peptide F2
 <223> (54)..(401)
 <223> mature peptide F1
 <223> (402)..(1748)
 <400> 1

```

agggataaag tcccttgatg gtgcttgatt gcaaaactct ccccttggga aacatgacag 60
catatatcca gagatcacag tgcatctcaa catcactact ggttggtctc accacattgg 120
tctcgtgtca gattcccagg gataggctct ctaacatagg ggtcatagtc gatgaaggga 180
aatcactgaa gataagctga tcccacgaat cgaggtagat agtactgagt ctagtccagg 240
gggtagactt tgagaatggg tgcggaacag cccaggttat ccagtacaag agcctactga 300
acaggctgtt aatccatttg agggatgcct tagatcttca ggaggctctg ataactgtca 360
ccaatgatac gacacaaaat gccggtgctc cacagtcgag attcttcggt gctgtgattg 420
gtactatcgc acttgagatg gcgacatcag cacaatcac cgcaggagatt gactagccg 480
aagcgaggga ggcacaaaag gacatagcgc tcacaaaaga atcgatgaca aaaacacaca 540
agtctataga actgctgcaa aacgctgtgg gggaacaaat tcttgctcta aagacactcc 600
aggatttcgt gaatgatgag atcaaaaccg caataagcga attaggctgt gaggctgctg 660
ccttaagact gggataaaaa ttgacacagc attactccga gctgttaact gcgttcggct 720
cgaatttcgg aaccatcggg gagaagagcc tcacgctgca ggcgctgtct tcactttact 780
ctgctaacat tactgagatt atgaccacaa tcaagacagg gcagtctaac atctatgatg 840
tcatttatac agaacagatc aaagggaacg tgatagatgt gcatctagag agatacatgg 900
tcacctgtc tgtgaagatc cctattcttt ctgaagtccc aggtgtgctc atacacaagg 960
catcatctat ttcttacaac atagacgggg aggaatggta tgtgactgtc cccagccata 1020
tactcagtcg tgcctcttct ttagggggtg cagacataac cgattgtgtt gaggccagat 1080
tgacctatat atgccccagg gatcccgac aactgatacc tgacagccag caaaagtgtg 1140
tcctggggga cacaacaagg tgcctgtgca caaaagttgt ggacagcctt atccccaagt 1200
ttgcttttgt gaatgggggc gttgttgcta actgcatagc atccacatgt acctgcggga 1260
caggccgaag accaatcagt caggatcgtc ctaaagggtg agtattccta acccatgaca 1320
actgtggtct tataggtgtc aatggggtag aattgtatgc taaccggaga ggcacagatg 1380
ccacttgggg ggtccagaac ttgacagtcg gtcctgcaat tgctatcaga cccattgata 1440
tttctctcaa ccttgctgat gctacgaatt tcttgcaaga ctctaaggct gaggctgaga 1500
aagcacggaa aatcctctcg gaggtaggta gatggtacaa ctcaagagag actgtgatta 1560
cgatcatagt agttatggtc gtaatatggg ttggtcattat agtgatcatc atcgtgcttt 1620
atagactcag aaggccaatg ctaatgggta atccagatga ccgtataccg agggacacat 1680
acacattaga gccgaagatc agacatatgt acacaaacgg tgggtttgat gcaatggctg 1740
agaaaagatg atcacgacca ttatcagatg tcttgtaaaq caggcatggt atccgttgag 1800
atctgtatat aat
  
```

1813

<210> 2
 <211> 565
 <212> PRT
 <213> Sendai virus

<223> F protein

<400> 2

Met Thr Ala Tyr Ile Gln Arg Ser Gln Cys Ile Ser Thr Ser Leu Leu
 1 5 10 15
 Val Val Leu Thr Thr Leu Val Ser Cys Gln Ile Pro Arg Asp Arg Leu
 20 25 30
 Ser Asn Ile Gly Val Ile Val Asp Glu Gly Lys Ser Leu Lys Ile Ala
 35 40 45
 Gly Ser His Glu Ser Arg Tyr Ile Val Leu Ser Leu Val Pro Gly Val
 50 55 60
 Asp Phe Glu Asn Gly Cys Gly Thr Ala Gln Val Ile Gln Tyr Lys Ser
 65 70 75 80
 Leu Leu Asn Arg Leu Leu Ile Pro Leu Arg Asp Ala Leu Asp Leu Gln
 85 90 95

 Glu Ala Leu Ile Thr Val Thr Asn Asp Thr Thr Gln Asn Ala Gly Ala
 100 105 110
 Pro Gln Ser Arg Phe Phe Gly Ala Val Ile Gly Thr Ile Ala Leu Gly
 115 120 125
 Val Ala Thr Ser Ala Gln Ile Thr Ala Gly Ile Ala Leu Ala Glu Ala
 130 135 140
 Arg Glu Ala Lys Arg Asp Ile Ala Leu Ile Lys Glu Ser Met Thr Lys
 145 150 155 160
 Thr His Lys Ser Ile Glu Leu Leu Gln Asn Ala Val Gly Glu Gln Ile
 165 170 175
 Leu Ala Leu Lys Thr Leu Gln Asp Phe Val Asn Asp Glu Ile Lys Pro
 180 185 190
 Ala Ile Ser Glu Leu Gly Cys Glu Thr Ala Ala Leu Arg Leu Gly Ile
 195 200 205
 Lys Leu Thr Gln His Tyr Ser Glu Leu Leu Thr Ala Phe Gly Ser Asn
 210 215 220
 Phe Gly Thr Ile Gly Glu Lys Ser Leu Thr Leu Gln Ala Leu Ser Ser
 225 230 235 240
 Leu Tyr Ser Ala Asn Ile Thr Glu Ile Met Thr Thr Ile Lys Thr Gly
 245 250 255
 Gln Ser Asn Ile Tyr Asp Val Ile Tyr Thr Glu Gln Ile Lys Gly Thr
 260 265 270
 Val Ile Asp Val Asp Leu Glu Arg Tyr Met Val Thr Leu Ser Val Lys
 275 280 285
 Ile Pro Ile Leu Ser Glu Val Pro Gly Val Leu Ile His Lys Ala Ser
 290 295 300
 Ser Ile Ser Tyr Asn Ile Asp Gly Glu Glu Trp Tyr Val Thr Val Pro
 305 310 315 320
 Ser His Ile Leu Ser Arg Ala Ser Phe Leu Gly Gly Ala Asp Ile Thr
 325 330 335
 Asp Cys Val Glu Ser Arg Leu Thr Tyr Ile Cys Pro Arg Asp Pro Ala
 340 345 350
 Gln Leu Ile Pro Asp Ser Gln Gln Lys Cys Ile Leu Gly Asp Thr Thr
 355 360 365
 Arg Cys Pro Val Thr Lys Val Val Asp Ser Leu Ile Pro Lys Phe Ala

21

22

370 375 380
 Phe Val Asn Gly Gly Val Val Ala Asn Cys Ile Ala Ser Thr Cys Thr
 385 390 395 400

 Cys Gly Thr Gly Arg Arg Pro Ile Ser Gln Asp Arg Ser Lys Gly Val
 405 410 415
 Val Phe Leu Thr His Asp Asn Cys Gly Leu Ile Gly Val Asn Gly Val
 420 425 430
 Glu Leu Tyr Ala Asn Arg Arg Gly His Asp Ala Thr Trp Gly Val Gln
 435 440 445
 Asn Leu Thr Val Gly Pro Ala Ile Ala Ile Arg Pro Ile Asp Ile Ser
 450 455 460
 Leu Asn Leu Ala Asp Ala Thr Asn Phe Leu Gln Asp Ser Lys Ala Glu
 465 470 475 480
 Leu Glu Lys Ala Arg Lys Ile Leu Ser Glu Val Gly Arg Trp Tyr Asn
 485 490 495
 Ser Arg Glu Thr Val Ile Thr Ile Ile Val Val Met Val Val Ile Leu
 500 505 510
 Val Val Ile Ile Val Ile Ile Ile Val Leu Tyr Arg Leu Arg Arg Ser
 515 520 525
 Met Leu Met Gly Asn Pro Asp Asp Arg Ile Pro Arg Asp Thr Tyr Thr
 530 535 540
 Leu Glu Pro Lys Ile Arg His Met Tyr Thr Asn Gly Gly Phe Asp Ala
 545 550 555 560

Met Ala Glu Lys Arg
 565

<210> 3

<211> 1883

<212> DNA

<213> Sendai virus

<220> cDNA to viral ss-RNA

<221> CDS

<222> (57)..(1784)

<223> HN protein

<400> 3

aqggtgaaag tgaggtcgcq cggacttta gctttcacct caaacaagca caqatcatgg 60
 atggtgatag gggcaaacgt gactcgtact ggtctacttc tcctagtggg agcactacaa 120
 aattagcatc aggttgggag aggtcaagta aagttgacac atggttgctg attctctcat 180
 tcaccagtg ggtttgtca attgccacag tgatcatctg taccataatt tctgctagac 240
 aaggtatag tatgaaagag tactcaatga ctgtagaggc attgaacatg agcagcaggg 300
 aggtgaaaga gtcacttacc agtctaataa ggcaagaggt tatagcaagg gctgtcaaca 360
 ttcagagctc tgtgcaaacc ggaatccag tcttgttgaa caaaaacagc agggatgtca 420
 tccagatgat tgataagtcg tgcagcagac aagagctcac tcagcactgt gagagtacga 480
 tcgcagtcca ccatgccgag ggaattgccc cacttgagcc acatagtttc tggagatgcc 540
 ctgtcggaga accgtatctt agctcagatc ctgaaatctc attgctgcct ggtccgagct 600
 tgttatctgg ttctacaacg atctctggat gtgttaggct cccttcactc tcaattggcg 660
 aggcaatcta tgccattca tcaaatctca ttacacaagg ttgtgctgac atagggaaat 720
 catatcaggt cctgcagcta ggtacatat cactcaattc agatatgac cctgatctta 780
 accccgtagt gtccacact tatgacatca acgacaatcg gaaatcatgc tctgtggtgg 840

23

24

caaccgggac taggggttat cagctttgct ccatgccgac tctagacgaa agaaccgact 900
 actctagtga tggatcagag gatctggtcc ttgatgtcct ggaatcctaa gggagaacta 960
 agtctcaccg gtatcgaac agcagagtag atcttgatca cccgttctct gactataacc 1020
 ccagtgtagg caacggcatt gcaacagaag gctcattgat atttcttggg tatggtggac 1080
 taaccacccc tctgcagggt gatacaaaat gtaggaccca aggatgccaa caggtgtcgc 1140
 aagacacatg caatgaggct ctgaaaatta catggctagg agggaaacag gtggtcagcg 1200
 tgatcatcca ggtcaatgac tatctctcag agaggccaaa gataagagtc acaaccattc 1260
 caatcactca aaactatctc ggggcggaag gtatgattatt aaaattgggt gatcgggtgt 1320
 acatctatac aagatcatca ggctggcact ctcaactgca gataggagta cttgatgtca 1380
 gccacccttt gactatcaac tggacacctc atgaagcctt gtctagacca ggaataaag 1440
 agtgcaattg gtacaataag tgtccgaagg aatgcatatc aggcgtatac actgatgctt 1500
 atccattgtc ccctgatgca gctaacgtcg ctaccgtcac gctatatgcc aatacatcgc 1560
 gtgtcaaccc aacaatcatg tattctaaca ctactaacat tataaatatg ttaaggataa 1620
 aggatgttca attagaggct gcatatacca cgacatcgtg tatcacgcat tttggtaaag 1680
 gctactgctt tcacatcatc gagatcaatc agaagagcct gaatacctta cagccgatgc 1740
 tctttaagac tagcatccct aaattatgca aggccgagtc ttaaatttaa ctgactagca 1800
 ggcttgtcgg ccttgcgtgc actaagatca tctccgaaca tccacaatat ctctcagctt 1860
 cttacgtctc tcacagtatt aag 1883

<210> 4

<211> 575

<212> PRT

<213> Sendai virus

<223> HN protein

<400> 4

Met Asp Gly Asp Arg Gly Lys Arg Asp Ser Tyr Trp Ser Thr Ser Pro
 1 5 10 15
 Ser Gly Ser Thr Thr Lys Leu Ala Ser Gly Trp Glu Arg Ser Ser Lys
 20 25 30
 Val Asp Thr Trp Leu Leu Ile Leu Ser Phe Thr Gln Trp Ala Leu Ser
 35 40 45
 Ile Ala Thr Val Ile Ile Cys Ile Ile Ile Ser Ala Arg Gln Gly Tyr
 50 55 60
 Ser Met Lys Glu Tyr Ser Met Thr Val Glu Ala Leu Asn Met Ser Ser
 65 70 75 80
 Arg Glu Val Lys Glu Ser Leu Thr Ser Leu Ile Arg Gln Glu Val Ile
 85 90 95
 Ala Arg Ala Val Asn Ile Gln Ser Ser Val Gln Thr Gly Ile Pro Val
 100 105 110
 Leu Leu Asn Lys Asn Ser Arg Asp Val Ile Gln Met Ile Asp Lys Ser
 115 120 125
 Cys Ser Arg Gln Glu Leu Thr Gln His Cys Glu Ser Thr Ile Ala Val
 130 135 140
 His His Ala Glu Gly Ile Ala Pro Leu Glu Pro His Ser Phe Trp Arg
 145 150 155 160
 Cys Pro Val Gly Glu Pro Tyr Leu Ser Ser Asp Pro Glu Ile Ser Leu
 165 170 175
 Leu Pro Gly Pro Ser Leu Leu Ser Gly Ser Thr Thr Ile Ser Gly Cys
 180 185 190
 Val Arg Leu Pro Ser Leu Ser Ile Gly Glu Ala Ile Tyr Ala Tyr Ser

25
 195
 Ser Asn Leu Ile Thr Gln Gly Cys Ala Asp Ile Gly Lys Ser Tyr Gln
 210
 215
 Val Leu Gln Leu Gly Tyr Ile Ser Leu Asn Ser Asp Met Ile Pro Asp
 225
 230
 235
 240
 Leu Asn Pro Val Val Ser His Thr Tyr Asp Ile Asn Asp Asn Arg Lys
 245
 250
 255
 Ser Cys Ser Val Val Ala Thr Gly Thr Arg Gly Tyr Gln Leu Cys Ser
 260
 265
 270
 Met Pro Thr Val Asp Glu Arg Thr Asp Tyr Ser Ser Asp Gly Ile Glu
 275
 280
 285
 Asp Leu Val Leu Asp Val Leu Asp Leu Lys Gly Arg Thr Lys Ser His
 290
 295
 300
 Arg Tyr Arg Asn Ser Glu Val Asp Leu Asp His Pro Phe Ser Ala Leu
 305
 310
 315
 320
 Tyr Pro Ser Val Gly Asn Gly Ile Ala Thr Glu Gly Ser Leu Ile Phe
 325
 330
 335

 Leu Gly Tyr Gly Gly Leu Thr Thr Pro Leu Gln Gly Asp Thr Lys Cys
 340
 345
 350
 Arg Thr Gln Gly Cys Gln Gln Val Ser Gln Asp Thr Cys Asn Glu Ala
 355
 360
 365
 Leu Lys Ile Thr Trp Leu Gly Gly Lys Gln Val Val Ser Val Ile Ile
 370
 375
 380
 Gln Val Asn Asp Tyr Leu Ser Glu Arg Pro Lys Ile Arg Val Thr Thr
 385
 390
 395
 400
 Ile Pro Ile Thr Gln Asn Tyr Leu Gly Ala Glu Gly Arg Leu Leu Lys
 405
 410
 415
 Leu Gly Asp Arg Val Tyr Ile Tyr Thr Arg Ser Ser Gly Trp His Ser
 420
 425
 430
 Gln Leu Gln Ile Gly Val Leu Asp Val Ser His Pro Leu Thr Ile Asn
 435
 440
 445
 Trp Thr Pro His Glu Ala Leu Ser Arg Pro Gly Asn Lys Glu Cys Asn
 450
 455
 460
 Trp Tyr Asn Lys Cys Pro Lys Glu Cys Ile Ser Gly Val Tyr Thr Asp
 465
 470
 475
 480
 Ala Tyr Pro Leu Ser Pro Asp Ala Ala Asn Val Ala Thr Val Thr Leu
 485
 490
 495
 Tyr Ala Asn Thr Ser Arg Val Asn Pro Thr Ile Met Tyr Ser Asn Thr
 500
 505
 510
 Thr Asn Ile Ile Asn Met Leu Arg Ile Lys Asp Val Gln Leu Glu Ala
 515
 520
 525
 Ala Tyr Thr Thr Thr Ser Cys Ile Thr His Phe Gly Lys Gly Tyr Cys
 530
 535
 540
 Phe His Ile Ile Glu Ile Asn Gln Lys Ser Leu Asn Thr Leu Gln Pro
 545
 550
 555
 560
 Met Leu Phe Lys Thr Ser Ile Pro Lys Leu Cys Lys Ala Glu Ser
 565
 570
 575

【図面の簡単な説明】

F1) の精製を示す。

【図1】図1は、HVJの融合タンパク質（HNおよび 50 (a) 界面活性剤で可溶化されたHVJの上清のタンパ

ク質成分を、超遠心後に、SDS-PAGE上で分析した。SDS-PAGE上での移動度によって、これらのタンパク質が、右側の矢印によって示されるように、HN、NP、F1およびMタンパク質であると推定された。

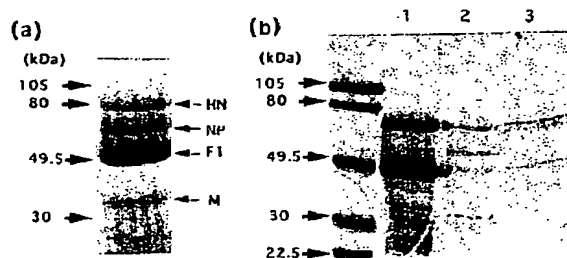
(b) 上清をイオン交換クロマトグラフィーにかけて、素通り画分(レーン1)および0.2M NaClでの溶出物(レーン2)のタンパク質成分をSDS-PAGE上で、分析した。この融合タンパク質を、脂質と混合し、そして透析によって、再構成融合粒子を構築した。F1およびHNの両方が再構成リボソームにおいて検出された(レーン3)。分子量マーカーを左側に矢印で示した。

【図2】図2は、遺伝子移入ビヒクルの構築を示す模式図である。HVJを、可溶化して、融合タンパク質を単離する。このタンパク質を、透析によってリボソーム中に挿入し、再構成融合粒子を形成する。プラスミドDNAまたはFITC-ODNを含有するリボソームを構築し、再構成融合粒子と融合し、遺伝子移入ビヒクルとして調製する。

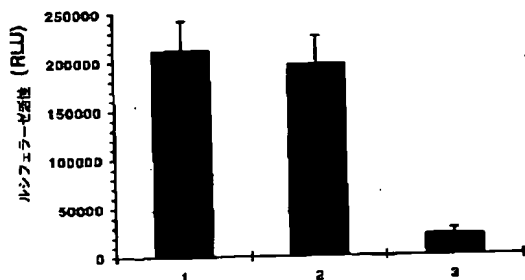
【図3】図3は、遺伝子移入ビヒクルによる、FITC-ODNのFL細胞への移入を示す。移入の30分後、全てのFL細胞中の蛍光を検出した(a)、一方、FITC-ODNを含まない遺伝子移入ビヒクルを使用した場合、蛍光は、観察されなかった(b)。左の図は、FITCの検出を示し、右の図は、核の検出のためのHoechst染色を示す。

*

【図1】



【図5】



*【図4】図4は、再構成融合粒子の安定性を示す。再構成融合粒子(四角)およびUV照射HVJ(丸)を、4℃で1~4週間保存した。毎週、FITC-ODNを含有するリボソームを、再構成融合粒子またはUV照射不活化HVJのいずれかと融合した。FL細胞へのFITC-ODN移入の効率を、約500細胞の蛍光性の核の計数によって測定した。三連の実験の平均および標準偏差を示す。

【図5】図5は、HEK239細胞中のルシフェラーゼ遺伝子の発現を示す。ルシフェラーゼ遺伝子をHEK239細胞に対して、(1)HVJリボソーム、(2)遺伝子移入ビヒクル、または(3)DTT処理した遺伝子移入ビヒクルを用いて移入した。

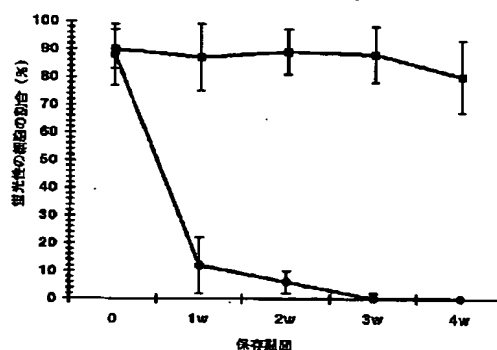
【図6】図6は、マウス骨格筋中でのLacZ発現を示す。(a) pAct-LacZ-NIIを含有する遺伝子移入ビヒクルを、C57BL/6マウスに注入した。

(b) ネガティブコントロールとして、空の遺伝子移入ビヒクルを、同一の筋肉に注入した。移入の3日後、LacZ遺伝子発現を、筋肉の凍結切片において、X-gal染色によって試験した。四頭筋の断面図を示す。

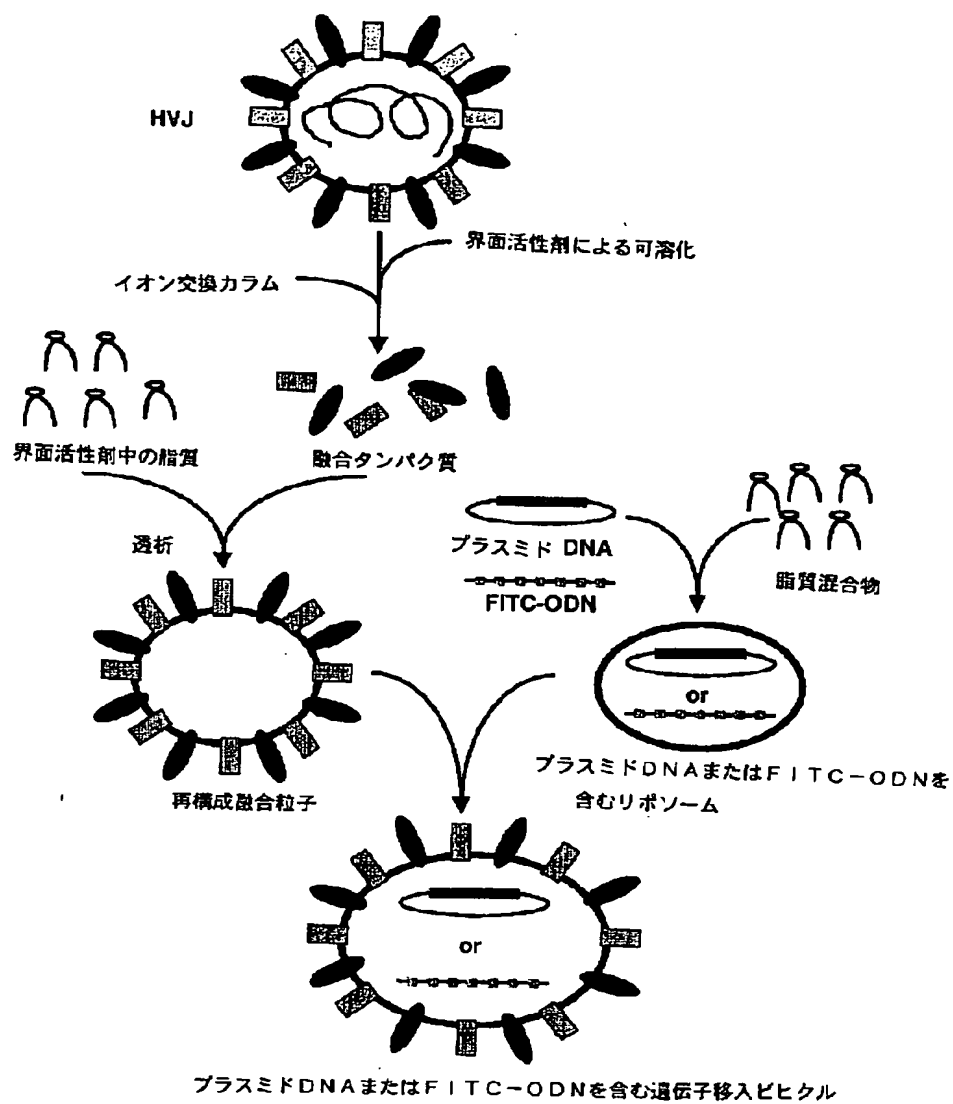
【図7】図7は、HVJ Z株由来のFタンパク質の核酸配列(配列番号1)およびアミノ酸配列(配列番号2)を示す。

【図8】図8は、HVJ Z株由来のHNタンパク質の核酸配列(配列番号3)およびアミノ酸配列(配列番号4)を示す。

【図4】

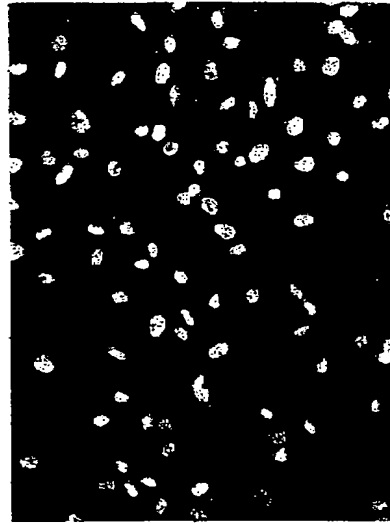
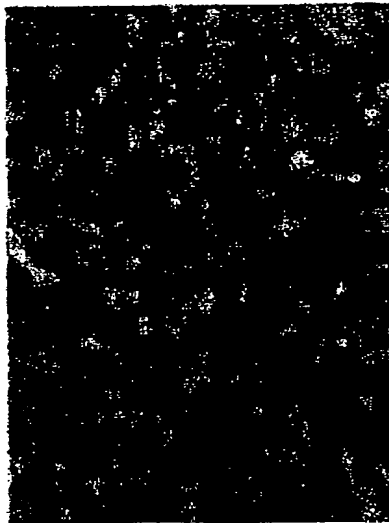


【図2】

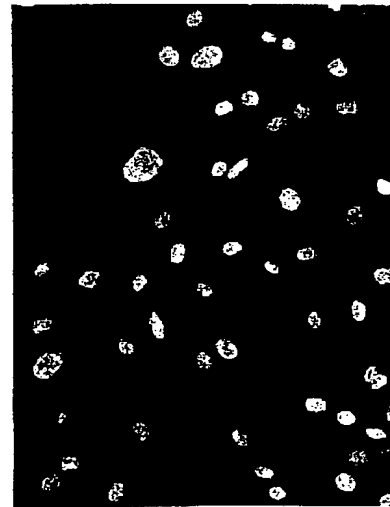


【図3】

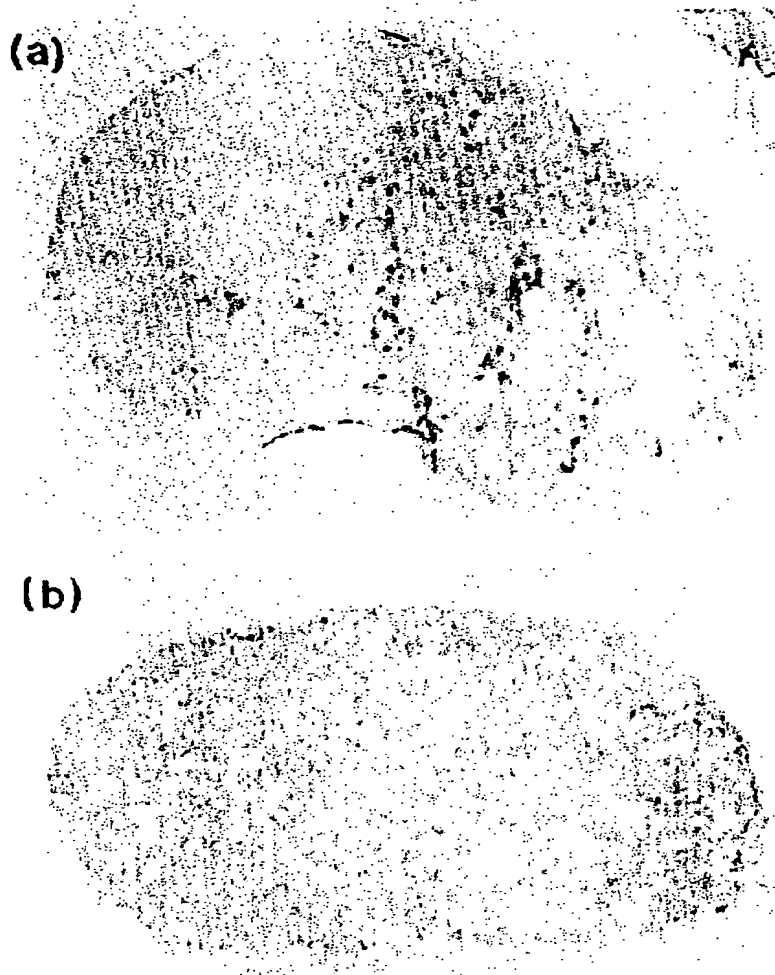
(a)



(b)



【図6】



【図7】

1-AGGATTAACCTCCCTTCGACCTCTGCTGCAAACTCTCCCTTGGCAAC ATC ACA GCA TAT ATC CAG AGA TCA CAG TGC ATC TCA ACA TCA
 Met Thr Ala Tyr Ile Gln Arg Ser Gln Cys Ile Ser Thr Ser -14
 96- CTA CTC GTT GTT CTC ACC ACA TTG CTC TCG TCT CAG ATT CCC AGG GAT AGS CTC TCT AAC ATA GGG GTC ATA GTC GAT GAA GGG
 Leu Leu Val Val Leu Thr Thr Leu Val Ser Cys Gln Ile Pro Arg Asp Arg Leu Ser Asn Ile Gly Val Ile Val Asp Glu Gly -42
 180- AAA TCA CTG AAG ATA GCT GGA TCC CAC GAA TCG AGG TAC ATA GTA CTG AGT CTA GTT CCG GGG GTA GAC TTT GAG AAT GGG TGC
 Lys Ser Leu Lys Ile Ala Gly Ser His Glu Ser Arg Tyr Ile Val Leu Ser Leu Val Pro Gly Val Asp Phe Glu Asn Gly Cys -70
 264- GGA ACA GGC CAG GTT ATC CAG TAC AAG AGC CTA CTG AAC AGG CTG TTA ATC CCA TTC AGG GAT CCC TTA GAT CTT CAG GAG GCT
 Gly Thr Ala Gln Val Ile Gln Tyr Lys Ser Leu Leu Asn Arg Leu Leu Ile Pro Leu Arg Asp Ala Leu Asp Leu Gln Glu Ala -98
 348- CTG ATA ACT CTC ACC AAT CAT ACC ACA CAA AAT CCC GGT GCT CCA CAG TCG AGA TTC TTC GGT GCT GTC ATT GGT ACT ATC GCA
 Leu Ile Thr Val Thr Asn Asp Thr Thr Gln Asn Ala Gly Ala Pro Gln Ser Arg Phe Phe Gly Ala Val Ile Gly Thr Ile Ala -126
 432- CTT GGA GTG GGG ACA TCA GCA CAA ATC ACC GCA GGG ATT GCA CTA GGC GAA GCG AGG GAG GCC AAA AGA GAC ATA GCG CTC ATC
 Leu Gly Val Ala Thr Ser Ala Gln Ile Thr Ala Gly Ile Ala Leu Ala Glu Ala Arg Glu Ala Lys Arg Asp Ile Ala Leu Ile -154
 516- AAA GAA TCG ATG ACA AAA ACA CAC AAG TCT ATA GAA CTG CTG CAA AAC GCT GTG GGG GAA CAA ATT CTT GCT CTA AAG ACA CTC
 Lys Glu Ser Met Thr Lys Thr His Lys Ser Ile Glu Leu Gln Asn Ala Val Gly Glu Gln Ile Leu Ala Leu Lys Thr Leu -182
 600- CAG GAT TTC GTG AAT GAT CAG ATC AAA CCC GCA ATA AGC GAA TTA GGC TCT CAG ACT GCT GGC TTA ACA CTC GCT ATA AAA TTC
 Gln Asp Phe Val Asn Asp Glu Ile Lys Pro Ala Ile Ser Glu Leu Gly Cys Glu Thr Ala Ala Leu Arg Leu Gly Ile Lys Leu -210
 684- ACA CAG CAT TAC TCC CAG CTC TTA ACT GCG TTC GGC TCG AAT TTC GGA ACC ATC GCA CAG AAG AGC CTC AGC CTG CAG GCG CTG
 Thr Gln His Tyr Ser Glu Leu Thr Ala Phe Gly Ser Asn Phe Gly Thr Ile Gly Glu Lys Ser Leu Thr Leu Glu Ala Leu -238
 768- TCT TCA CTT TAC TCT GCT AAC ATT ACT CAG ATT ATG ACC ACA ATC AAG ACA GCG CAG TCT AAC ATC TAT GAT GTC ATT TAT ACA
 Ser Ser Leu Tyr Ser Ala Asn Ile Thr Glu Ile Met Thr Thr Ile Lys Thr Gly Gln Ser Asn Ile Tyr Asp Val Ile Tyr Thr -266
 852- GAA CAG ATC AAA GGA AGC GTG ATA GAT GTG GAT CTA GAG AGA TAC ATG GTC ACC CTG TCT GTG AAG ATC CCT ATT CTT TCT GAA
 Glu Gln Ile Lys Gly Thr Val Ile Asp Val Asp Leu Glu Arg Tyr Met Val Thr Leu Ser Val Lys Ile Pro Ile Leu Ser Glu -294
 936- GTC CCA GGT GTG CTC ATA CAC AAG GCA TCA TCT ATT TCT TAC AAC ATA GAC GGG CAG CAA TCG TAT CTG ACT CTC CCC AGC CAT
 Val Pro Gly Val Leu Ile His Lys Ala Ser Ser Ile Ser Tyr Asn Ile Asp Gly Glu Glu Trp Tyr Val Thr Val Pro Ser His -322
 1020- ATA CTC AGT GGT GCT TCT TTC TTA GGG GGT GCA GAC ATA ACC GAT TGT GTT CAG TCC ACA TTG ACC TAT ATA TCG CCC AGG GAT
 Ile Leu Ser Arg Ala Ser Phe Leu Gly Gly Ala Asp Ile Thr Asp Cys Val Glu Ser Arg Leu Thr Tyr Ile Cys Pro Arg Asp -350
 1104- CCC GCA CAA CTG ATA CCT GAC ACC CAG CAA AAG TGT ATC CTG GGG GAC ACA ACA AGG TGT CCT CTC ACA AAA CTT CTC GAC AGC
 Pro Ala Gln Leu Ile Pro Asp Ser Gln Gln Lys Cys Ile Leu Gly Asp Thr Thr Arg Cys Pro Val Thr Lys Val Val Asp Ser -378
 1188- CTT ATC CCC AAG TTT GCT TTT GTG AAT GGG GGC GTT GTT GCT AAC TGC ATA GCA TCC ACA TGT ACC TCC GGG ACA GGC CGA AGA
 Leu Ile Pro Lys Phe Ala Phe Val Asn Gly Gly Val Val Ala Asn Cys Ile Ala Ser Thr Cys Thr Cys Gly Thr Gly Arg Arg -406
 1272- CCA ATC AGT CAG GAT CCC TCT AAA GGT GTA GTA TTC CTA ACC CMT GAC AAC TGT GCT CTT ATA GGT CTC AAT CCC CTA GAA TTG
 Pro Ile Ser Gln Asp Arg Ser Lys Gly Val Val Phe Leu Thr His Asp Asn Cys Gly Leu Ile Gly Val Asn Gly Val Glu Leu -434
 1356- TAT GCT AAC CCG AGA GGG CAC GAT GCT ACT TCG GGG CTC CAG AAC TTG ACA CTC GGT CCT GCA ATT GCT ATC AGA CCC ATT GAT
 Tyr Ala Asn Arg Arg Gly His Asp Ala Thr Trp Gly Val Gln Asn Leu Thr Val Gly Pro Ala Ile Ala Ile Arg Pro Ile Asp -462
 1440- ATT TCT CTC AAC CTT GCT CAT CCT ACC AAT TTC TTG CAA GAC TCT AAG GCT GAG CTT GAG AAA GCA GGG AAA ATC CTC TCG CAG
 Ile Ser Leu Asn Leu Ala Asp Ala Thr Asn Phe Leu Gln Asp Ser Lys Ala Glu Leu Glu Lys Ala Arg Lys Ile Leu Ser Glu -490
 1524- GTA GGT AGA TCG TAC AAC TCA AGA GAG ACT GTG ATT AGG ATC ATA GTA GTT ATU GTC GTA ATA TTG GTC GTC ATT ATA GTG ATC
 Val Gly Arg Trp Tyr Asn Ser Arg Glu Thr Val Ile Thr Ile Ile Val Val Met Val Val Ile Leu Val Val Ile Ile Val Ile -518
 1608- ATC ATC GTG CTT TAT AGA CTC AGA AGG TCA ATG CTA ATG GGT AAT CCA GAT GAC GGT ATA CCG AGG GAC ACA TAC ACA TTA GAG
 Ile Ile Val Leu Tyr Arg Leu Arg Arg Ser Met Leu Met Gly Asn Pro Asp Asp Arg Ile Pro Arg Asp Thr Tyr Thr Leu Glu -546
 1692- CCG AAG ATC AGA CAT ATC TAC ACA AAC GGT GGG TTT GAT GCA ATC GCT CAG AAA AGA TGAACGACCAATATCAGATCTCTTAAGCAG
 Pro Lys Ile Arg His Met Tyr Thr Asn Gly Gly Phe Asp Ala Met Ala Glu Lys Arg ...
 1784- GCATGGATATCGGTCGACATCTGTATATAT

【図8】

1-AGGGTCAAGTGAAGTGGCGGGTACTTTAGCTTTACCTCAACAAACCAACATC ATC CAT CCT GAT AGG GGC AAA CGT GAC TCG TAC TGG TCT
 met asp gly asp arg gly lys arg asp ser tyr trp ser -13

98- AET TCT CCT AGT GGT AGC ACT ACA AAA TTA GCA TCA GGT TGG GAG AGG TCA AGT AAA GTT GAC ACA TGG TTG CTG ATT CTC TCA
 thr ser pro ser gly ser thr thr lys leu ala ser gly trp glu arg ser ser lys val asp thr trp leu leu ile leu ser -41

180- TTC ACC CAG TGG GCT TTG TCA ATT GCG ACA GTG ATC ATC TGT ATC ATA ATT TCT GCT AGA CAA GGG TAT AGT ATG AAA GAG TAC
 phe thr gln trp ala leu ser ile ala thr val ile ile cys ile ile ile ser ala arg gln gly tyr ser met lys glu tyr -69

264- TCA ATG ACT CTA GAG GCA TTG AAC ATG ACC AGC AGG GAG GTG AAA GAG TCA CTT ACC AGT CTA ATA AGG CAA GAG GTT ATA GCA
 ser met thr val glu ala leu asn met ser ser arg glu val lys glu ser leu thr ser leu ile arg gln glu val ile ala -97

348- AGS GCT GTC ARC ATT CAG AGC TCT GTG CAA ACC CGA ATC CCA CTC TTG TTG AAC AAA AAC AGC AGG GAT GTC ATC CAG ATG ATT
 arg ala val asn ile gln ser ser val gln thr gly ile pro val leu leu asn lys asn ser arg asp val ile gln met ile -125

432- GAT AAG TCG TGC AGC AGA CAA GAG CTC ACT CAG CAC TGT GAG AGT AGC ATC GCA GTC CAC CAT GCC GAG GGA ATT GCC CCA CTT
 asp lys ser cys ser arg gln glu leu thr gln his cys glu ser thr ile ala val his his ala glu gly ile ala pro leu -153

516- GAG CCA CAT AAT TTC TGG AGA TGC CTT GTC GGA GAA CCG TAT CTT AGC TCA CAT CCT GAA ATC TCA TTG CTG CCT GAT CCG AGC
 glu pro his ser phe trp arg cys pro val gly glu pro tyr leu ser ser asp pro glu ile ser leu leu pro gly pro ser -181

600- TTG TTA TCT GGT TCT ACA AGC ATC TCT GGA TGT GTT AGG CTC CTT TCA CTC TCA ATT GGC GAG GCA ATC TAT GCG TAT TCA TCA
 leu leu ser gly ser thr thr ile ser gly cys val arg leu pro ser leu ser ile gly glu ala ile tyr ala tyr ser ser -209

684- AAT CTC ATT ACA CAA GGT TGT GCT GAC ATA GGG AAA TCA TAT CAG GTC CTG CAG CTA GGG TAC ATA TCA CTC AAT TCA GAT ATG
 asn leu ile thr gln gly cys ala asp ile gly lys ser tyr gln val leu gla leu gly tyr ile ser leu asn ser asp met -237

768- ATC CTT GAT CTT AAC CCC GTA GTG TCC CAC ACT TAT GAC ATC AAC GAC AAT CGG AAA TCA TGC TCT GTG GTG GCA ACC GGG ACT
 ile pro asp leu asn pro val val ser his thr tyr asp ile asn asp asn arg lys ser cys ser val val ala thr gly thr -265

852- AGG GGT TAT CAG CTT TGC TCC ATG CCG ACT GTA GAC GAA AGA ACC GAC TAC TCT AGT GAT GGT ATC CAG GAT CTC CTC CTT GAT
 arg gly tyr gln leu cys ser met pro thr val asp glu arg thr asp tyr ser ser asp gly-ile glu asp leu val leu asp -293

936- GTC CTG GAT CTC AAA GGG AGA ACT AAG TCT CAC CGG TAT CGC AAC AGC GAG GTA GAT CTT GAT CAC CCG TTC TCT GCA CTA TAC
 val leu asp leu lys gly arg thr lys ser his arg tyr arg asn ser glu val asp leu asp his pro phe ser ala leu tyr -321

1020- CCC AGT GTA GGC AAC GGC ATT GCA ACA GAA GGC TCA TTG ATA TTT CFI GGG TAT GGT GGA CTA ACC ACC CTT CTG CAG GGT GAT
 pro ser val gly asn gly ile ala thr glu gly ser leu ile phe leu gly tyr gly gly leu thr thr pro leu gln gly asp -349

1104- ACA AAA TGT AGG ACC CAA GGA TGC CAA CAG GTG TCG CAA GAC ACA TGC AAT GAG GCT CTG AAA ATT ACA TGG CTA GGA GGG AAA
 thr lys cys arg thr gla gly cys gln gln val ser gln asp thr cys asn glu ala leu lys ile thr trp leu gly gly lys -377

1188- CAG GTG GTC AGC GTG ATC ATC CAG GTC AAT GAC TAT CTC TCA CAG ACC CCA AAG ATA AGA GTC ACA ACC ATT GCA ATC ACT CAA
 gln val val ser val ile ile gln val asn asp thr leu ser glu arg pro lys ile arg val thr thr ile pro ile thr gla -405

1272- AAC TAT CTC GGG GCG GAA GGT AFA TTA TTA AAA TTG GGT GAT CGG GTG TAC ATC TAT ACA AGA TCA TCA GGC TGG CAC TCT CAA
 asn tyr leu gly ala gla gly arg leu leu lys leu gly asp arg val tyr ile tyr thr arg ser ser gly trp his ser gla -423

1356- CTO CAG ATA GGA GTA CTT GAT GTC AGC CAC CCT TTG ACT ATC AAC TGG ACA CCT CAT GAA GGC TTG TCT AGA CCA GGA AAT AAA
 leu gln ile gla val leu asp val ser his pro leu thr ile asn trp thr pro his glu ala leu ser arg pro gly asn lys -467

1440- GAG TGC AAT TGG TAC AAT AAG TGT CCG ARG GAA TGC ATA TCA GGC GTA TAC ACT GAT GCT TAT CCA TTG TCC CCT GAT GCA GCT
 glu cys asn trp tyr asn lys cys pro lys glu cys ile ser gly val tyr thr asp ala tyr pro leu ser pro asp ala ala -489

1524- AAC GTC GCT ACC GTC ACC CTA TAT GCC AAT ACA TCG CGT GTC AAC CCA ACA ATC ATG TAT TCT AAC ACT ACT AAC ATT ATA AAT
 asn val ala thr val thr leu tyr ala asn thr ser arg val asn pro thr ile met tyr ser asn thr thr asn ile ile asn -517

1608- ATE TTA AGG ATA AAG GAT GTT CAA TTA GAG GCT GCA TAT ACC AGC ACA TCG TGT ATC AGC CAT TTT GGT AAA GGC TAC TGG TTT
 met leu arg ile lys asp val gln leu glu ala ala tyr thr thr thr ser cys ile thr his phe gly lys gly tyr cys phe -545

1692- CAG ATC ATC CAG ATC AAT CAG AAG AGC CTG AAT ACC TTA CAG CCG ATG CTC TTT AAG ACT AGC ATC CCT AAA ITA TGC AAG GCC
 his ile ile gln ile ala gln lys ser leu asn thr leu gln pro met leu phe lys thr ser ile pro lys leu cys lys ala -573

1776- GAG TCT TAAATTTAAGTGAAGTGGCGGGTACTTTAGCTTTACCTCAACAAACCAACATC TCGAATCCACAAATATCTCTCAGTCTCTACAGTATTAAAG -1883
 glu ser ***

フロントページの続き

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA80 CA02 DA03 EA04
 FA20 GA13 HA17
 4B064 CA02 CA10 CA19 CB06 CC24
 DA01
 4C084 AA06 AA13 BA03 CA01 DC50
 NA14 ZB332
 4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA55
 CA01 EA20 FA72 FA74 GA01
 GA10 GA15 GA23 HA06

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.